

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

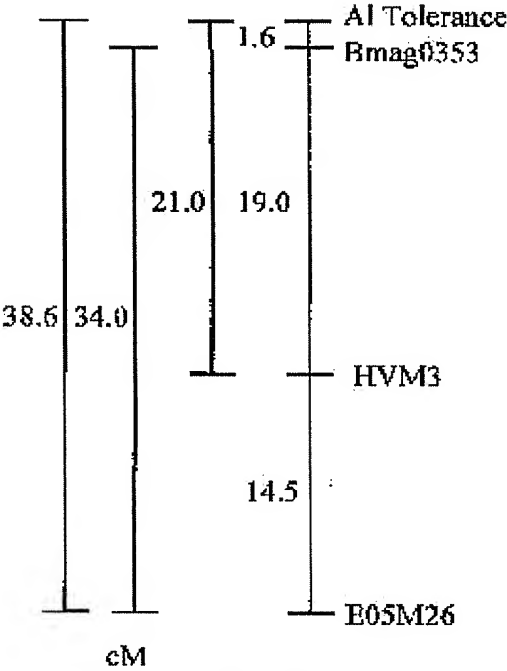
(11)Publication number : 2002-291474
(43)Date of publication of application : 08.10.2002

(51)Int.Cl. C12N 15/09
A01H 5/00
C12Q 1/68
 //(C12Q 1/68
C12R 1:91)

(21)Application number : 2001-097221 (71)Applicant : JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY CORP
(22)Date of filing : 29.03.2001 (72)Inventor : SATO KAZUHIRO
TAKEDA KAZUYOSHI

(54) DNA MARKER LINKED TO ALUMINUM-RESISTANT FACTOR, AND ITS UTILIZATION

(57)Abstract:
PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a DNA marker which is present in the genome DNA of barley and is linked to an aluminum-resistant factor, and to provide a method for utilizing the same.
SOLUTION: Marker Bmag 0353 is a DNA marker which is present in the genome DNA of barley, can be amplified with a pair of primers described in the following sequence numbers 1 and 2, and is linked to an aluminum-resistant factor, and is placed at a position separated from the aluminum-resistant factor in a distance of about 1.6 centimorgan (cM). Sequence number 1: actagtaccc actatgcacg a. Sequence number 2: acgttcatta aaatcacac tg. The marker Bmag 0353 can be used to predict in a high probability whether a species is or is not an aluminum-resistant species, thus facilitating the selection of the resistant species.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]
[Date of sending the examiner's decision of rejection]
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
[Date of final disposal for application]
[Patent number]
[Date of registration]
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-291474
(P2002-291474A)

(43) 公開日 平成14年10月8日 (2002.10.8)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 0 1 H 5/00	A 2 B 0 3 0
A 0 1 H 5/00		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 R 1:91	4 B 0 6 3
// (C 1 2 Q 1/68		C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 R 1:91)			
審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全 11 頁)			

(21) 出願番号 特願2001-97221(P2001-97221)

(22) 出願日 平成13年3月29日 (2001.3.29)

(71) 出願人 396020800
科学技術振興事業団
埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(72) 発明者 佐藤 和広
岡山県倉敷市有城1169-40
(72) 発明者 武田 和義
岡山県倉敷市有城1169-171
(74) 代理人 100080034
弁理士 原 謙三

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルミニウム耐性因子に連鎖するDNAマーカー、及びその利用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 オオムギのゲノムDNA中に存在し、かつアルミニウム耐性因子に連鎖するDNAマーカー、及びその利用方法の提供。

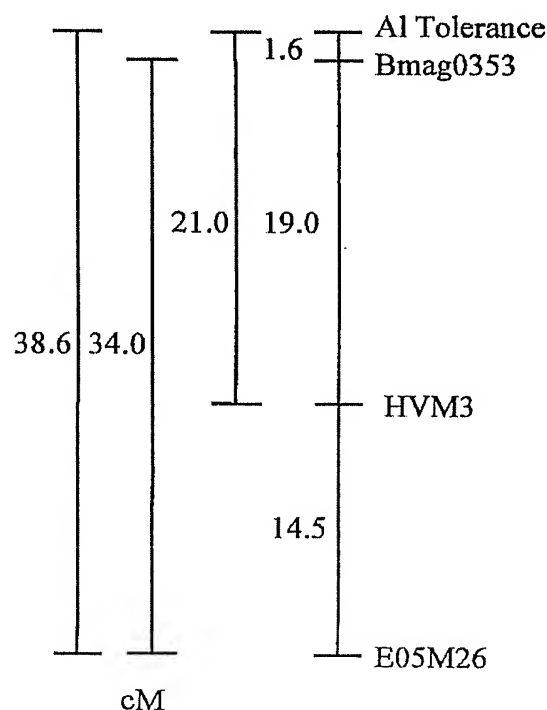
【解決手段】 マーカーBmag0353は、オオムギのゲノムDNA中に存在し、下記配列番号1及び配列番号2に記載の一組のプライマーを用いて増幅される、アルミニウム耐性因子に連鎖したDNAマーカーであり、アルミニウム耐性因子から約1.6センチモルガン(cM)の距離に位置している。このマーカーBmag0353を用いることにより、アルミニウム耐性種か否かを高い確率で予測でき、耐性種の選抜も容易になる。

配列番号1

a c t a g t a c c c a c t a t g c a c g a

配列番号2

a c g t t c a t t a a a a t c a c a a c t g



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 オオムギのゲノム DNA 中に存在し、配列番号 1 および配列番号 2 に記載の一組のプライマーを用いて増幅される、アルミニウム耐性因子に連鎖した DNA マーカー。

【請求項 2】 請求項 1 に記載の DNA マーカーであって、上記アルミニウム耐性因子から約 1.6 センチモルガン (cM) の距離に位置することを特徴とする DNA マーカー。

【請求項 3】 配列番号 1 および配列番号 2 に記載の一組のプライマーを用いてオオムギのゲノム DNA を鋳型とする増幅反応を行い、増幅パターンの相違から上記オオムギのゲノム DNA がアルミニウム耐性因子を有するか否かを判定することを特徴とする、アルミニウム耐性因子の有無の判別方法。

【請求項 4】 配列番号 1 および配列番号 2 に記載の一組のプライマーを用いてオオムギのゲノム DNA を鋳型とする増幅反応を行い、増幅パターン相違から上記オオムギのアルミニウム耐性の程度を判定することを特徴とする、アルミニウム耐性の判定方法。

【請求項 5】 請求項 1 または 2 に記載の DNA マーカーを用いてアルミニウム耐性因子を含む DNA 断片を単離することを特徴とする、アルミニウム耐性因子を含む DNA 断片の単離方法。

【請求項 6】 請求項 5 に記載の単離方法により得られたアルミニウム耐性因子を含む DNA 断片を植物のゲノム DNA に導入することによって作出された、アルミニウム耐性がより増強されてなる形質転換植物。

【請求項 7】 請求項 5 に記載の単離方法により得られたアルミニウム耐性因子を含む DNA 断片をオオムギのゲノム DNA に導入することによって作出された、アルミニウム耐性がより増強されてなる形質転換オオムギ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、オオムギのゲノム DNA 中に存在し、かつアルミニウム耐性を付与する遺伝子（以下、「アルミニウム耐性因子」という）に連鎖する DNA マーカー、及びその利用に関し、特に、これに限定されるものではないが、該アルミニウム耐性因子から約 1.6 センチモルガンの距離に位置し、該アルミニウム耐性因子と強連鎖する DNA マーカー、及びその利用に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 酸性土壌は世界で 338,517 × 10⁴ ヘクタールも分布し、耕作地の 30.7% を占めるとされている。このような土地で作物を栽培するには石灰等による土壌酸性の矯正を必要とするが、大面積の酸性土壌に石灰を散布することは経済的にも困難であるため、耐性品種を栽培することが対策として考えられている。

【0003】 酸性土壌における作物の主な生育阻害要因

はアルミニウムイオンによる根の伸長阻害とされており、禾穀類の中では特にオオムギが、アルミニウムイオンによる根の成長阻害を起こし易いことが知られている。そのためオオムギの酸性土壌耐性を評価することが水耕法などにより試みられてきた。

【0004】 Ma et al. (1997) は、水耕栽培したオオムギにおけるアルミニウム耐性の種内変異にコムギを超えるものは見出されなかったものの、ある程度の変異を有していると述べている (Plant and Soil, 191:133-137)。

また, Stolen et al. (1978) は、複数組合せの耐性品種と感受性品種間の F₂ 集団を圃場で検定し、全ての交配組合せにおいて耐性は単因子支配であり、さらに、形質マーカー系統との交配によりアルミニウム耐性因子が染色体 4H の三叉芒 (K) と連鎖すると述べている (Hereditas 88:101-105)。その他にも、耐性の分離をヘマトキシリン染色法により評価して単因子支配であるとする報告 (Minella et al. (1992) Crop Sci. 32:593-598) や、トリソミックス分析により 'Dayton' の耐性因子が染色体 4H に座乗するとした報告 (Minella et al. (1997) Plant Breeding, 116:465-469) がある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 ところで、近年分子マーカーによる有用形質のマッピングが行われ、有用遺伝子に連鎖した DNA マーカーが多く見い出されている。このような DNA マーカーを利用すれば、特定の有用遺伝子の有無を高い確率で予測できるので、例えば、1) 有用遺伝子を有する植物体の選抜、2) 有用遺伝子の植物体への導入、3) 植物体への有用遺伝子導入の成否判定、などに利用でき、特に作物育種の分野での応用が期待される。

【0006】 しかしながら、オオムギではこれまで、植物体にアルミニウム耐性を付与する耐性因子（アルミニウム耐性因子）に、実用上充分な程度に連鎖した DNA マーカーは見い出されていなかった。したがって、もしこのような DNA マーカーが得られれば、オオムギのアルミニウム耐性の有無の判別や、アルミニウム耐性因子を含む DNA 断片の単離が容易となり、ひいては、改善されたアルミニウム耐性を有する品種の作出など、各種育種プログラムへの応用が可能となる。

【0007】 本発明は、上記従来の問題に鑑みなされたものであり、その目的は、オオムギのゲノム DNA 中に存在し、かつアルミニウム耐性因子に連鎖する DNA マーカー、及びその利用方法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明にかかる DNA マーカーは、上記の課題を解決するために、オオムギのゲノム DNA 中に存在し、配列番号 1 および配列番号 2 に記載の一組のプライマーを用いて増幅される、アルミニウム耐性因子に連鎖した DNA マーカーであることを特徴としている。

【0009】本発明のDNAマーカーは、アルミニウム耐性因子に連鎖しているので、例えば、オオムギのある品種がアルミニウム耐性因子を有するか否かを、このDNAマーカーの有無を指標として、高い確率で予測できる。また、このDNAマーカーの有無を指標として、オオムギのゲノムDNAのライブラリーなどから、アルミニウム耐性因子を有するDNA断片をスクリーニングし、単離することも可能となる。

【0010】本発明のDNAマーカーがアルミニウム耐性因子から約1.6センチモルガン(cM)の距離に位置することは好ましく、このようにアルミニウム耐性因子と強連鎖している程、アルミニウム耐性因子の有無を判別する指標として有効である。

【0011】本発明にかかるアルミニウム耐性因子の有無の判別方法は、上記の課題を解決するために、配列番号1および配列番号2に記載の一組のプライマーを用いてオオムギのゲノムDNAを鋳型とする増幅反応を行い、増幅パターンの相違から上記オオムギのゲノムDNAがアルミニウム耐性因子を有するか否かを判定することを特徴としている。

【0012】上記の方法によれば、オオムギの様々な品種について、簡単な方法でアルミニウム耐性因子の有無を判定することが可能となる。よって、例えば、オオムギ品種の育種に際し、交配親の候補の中からアルミニウム耐性因子を有するものを比較的容易に選別することが可能となる。また、交配により得られた雑種についても、この雑種がアルミニウム耐性因子を有するか否かを比較的容易に判別することが可能となる。

【0013】本発明にかかるアルミニウム耐性の判定方法は、上記の課題を解決するために、配列番号1および配列番号2に記載の一組のプライマーを用いてオオムギのゲノムDNAを鋳型とする増幅反応を行い、増幅パターンの相違から上記オオムギのアルミニウム耐性の程度を判定することを特徴としている。

【0014】上記の方法によれば、オオムギの様々な品種について、簡単な方法でアルミニウム耐性の有無、並びに耐性の程度を判定することが可能となる。よって、例えば、オオムギ品種の育種に際し、交配親の候補の中からアルミニウム耐性の特に優れたものを比較的容易に選別することが可能となる。また、交配により得られた雑種についても、この雑種がアルミニウム耐性を有するか否か、また有する耐性の程度を比較的容易に判別することが可能となる。

【0015】本発明にかかるアルミニウム耐性因子を含むDNA断片の単離方法は、上記本発明のDNAマーカーを用いてアルミニウム耐性因子を含むDNA断片を単離することを特徴としている。

【0016】上述したように、本発明のDNAマーカーは、アルミニウム耐性因子に連鎖し、好ましくは該アルミニウム耐性因子から約1.6センチモルガン(cM)

の距離に位置している。そのため、このDNAマーカーを指標として、上記アルミニウム耐性因子を含むDNA断片を単離することができる。

【0017】例えば、オオムギのゲノムDNA全てを断片化したゲノムDNAライブラリーをスクリーニングして、上記のDNAマーカーを有するDNA断片を取得すれば、該DNA断片はアルミニウム耐性因子の一部または全長を有する可能性がある。なお、該DNA断片がアルミニウム耐性因子の一部のみ、またはその近傍の領域のみを有する場合には、該DNA断片に隣接するDNA断片についてコンテグ地図を作成し、アルミニウム耐性因子の全長の塩基配列を決定した上で、アルミニウム耐性因子の全長を含むようなDNA断片を調製すればよい。

【0018】また、本発明にかかる形質転換植物は、上記の単離方法により得られたアルミニウム耐性因子を含むDNA断片を植物のゲノムDNAに導入することによって作出された、アルミニウム耐性がより増強されてなる形質転換植物である。

【0019】本発明の形質転換植物は、アルミニウム耐性がより増強されているため、これにより、酸性土壌でも生育可能な植物品種が得られることとなる。なお、形質転換植物の作出には、上記アルミニウム耐性因子を含むDNA断片を、公知の方法により、アグロバクテリウムまたはパーティクルガンを用いて植物のゲノムDNAに導入することによって、該形質転換植物を作出すればよい。

【0020】ここで、「形質転換植物」とは、形質転換植物およびその組織を含む意義であり、形質転換植物およびその組織は、遺伝子を導入したプロトプラスト、カルス、再生個体(初代植物)およびその子孫植物、さらには植物個体から単離された植物組織(根、茎、葉等)および種子等が含まれる。

【0021】本発明の形質転換植物の種類(対象)は、特に限定されるものではなく、すべての植物について本発明の形質転換植物として作出が可能であり、例えば、食用作物、果樹や野菜、花きその他の有効樹目を含む園芸作物、工芸作物、さらには飼肥料作物等の作物が作出可能な植物の代表例として挙げられる。なお、上記した食用作物、園芸作物、工芸作物、飼肥料作物に各々含まれる具体的な作物については、例えば、農学大辞典改訂第4版(養賢堂・1997年4月30日発行)の目次8~16頁等にも詳しく記載されている。また、酸性土壌耐性は、ハウレンソウや甜菜などのアカザ科の作物、麦類などのイネ科作物など広範囲の植物で問題となっており、このような植物についても本発明を適用することにより、酸性土壌で充分生育可能な植物品種の獲得が期待できる。

【0022】また、本発明にかかる形質転換オオムギは、上記の単離方法により得られたアルミニウム耐性因

子を含む DNA 断片をオオムギのゲノム DNA に導入することによって作出された、アルミニウム耐性がより増強されてなる形質転換オオムギである。

【0023】本発明の形質転換オオムギは、アルミニウム耐性がより増強されているため、これにより、酸性土壌でも生育可能なオオムギ品種が得られることとなる。なお、形質転換オオムギの作出には、上記アルミニウム耐性因子を含む DNA 断片を、公知の方法により、アグロバクテリウムまたはパーティクルガンを用いてオオムギのゲノム DNA に導入することによって、該形質転換

オオムギを作出すればよい。

【0024】ここで、「形質転換オオムギ」とは、形質転換オオムギおよびその組織を含む意義であり、形質転換オオムギおよびその組織は、遺伝子を導入したプロトプラスト、カルス、再生個体（初代植物）およびその子孫植物、さらには植物個体から単離された植物組織（根、茎、葉等）および種子等が含まれる。

【0025】

【発明の実施の形態】本発明の実施の一形態について説明すれば、以下のとおりである。なお、言うまでもないが、本発明は、特に本実施の形態の記載内容のみに限定されるものではない。

【0026】本発明において「アルミニウム耐性因子」とは、オオムギのゲノム DNA 中、より具体的には 4H 染色体上に座乗する優性遺伝子であって、優性ホモ型およびヘテロ型の遺伝子型で、オオムギにアルミニウム耐性を付与する特性を有する遺伝子のことをいう。

【0027】また、本発明にかかる「DNA マーカー」とは、配列番号 1 および配列番号 2 に記載の一组のプライマーを用いて増幅される、上記アルミニウム耐性因子に連鎖した DNA マーカーを指す。このような DNA マーカーは、上記アルミニウム耐性因子を有するオオムギのゲノム DNA を抽出し、このゲノム DNA を鋳型として配列番号 1 および配列番号 2 に記載のプライマーを用いて増幅し、増幅 DNA 断片として単離することができる。

【0028】増幅に際して鋳型として用いられるゲノム DNA は、オオムギの植物体より従来公知の方法で抽出可能である。具体的には、植物体からゲノム DNA を抽出するための一般法（Murray, M.G. and W.F. Thompson (1980) Nucleic Acids Res. 8:4321-4325. など参照）が好適な例として挙げられる。また、上記のゲノム DNA は、根、茎、葉、生殖器官など、オオムギの植物体を構成するいずれの組織を用いても抽出可能である。また、場合によってはオオムギのカルスから抽出してもよい。なお、上記生殖器官には、花器官（雄性・雌性生殖器官を含む）や種子も含まれる。ゲノム DNA の抽出は、例えば、オオムギの芽生え期の葉を用いて行われる。この理由としては、組織の摩砕が比較的容易であり、多糖類などの不純物の混合割合が比較的少なく、また、種子が

ら短期間で育成可能である点が挙げられる。

【0029】オオムギのゲノム DNA を鋳型とし、配列番号 1 および配列番号 2 に記載のプライマーを用いて増幅する方法は、従来公知の DNA 増幅法を採用することができる。一般には、PCR 法（ポリメラーゼ連鎖反応法）や、その改変法が用いられる。PCR 法や、その改変法を用いる際の反応条件は特に限定されるものではなく、通常と同様の条件下で増幅することができる。

【0030】なお、増幅の条件にもよるが、配列番号 1 および配列番号 2 に記載の配列を有するプライマーは比較的短いオリゴヌクレオチドであるため、長さが異なる複数種の DNA 断片が増幅されてくる可能性がある。この場合、この中の約 110bp の DNA 断片が、本発明の DNA マーカーに相当する。

【0031】後に詳述するが、上記の約 110bp の DNA 断片は、極めて高い確率で、アルミニウム耐性を有すると判定されたオオムギ個体のゲノム DNA を鋳型とした場合には増幅され、アルミニウム感受性と判定されたオオムギ個体のゲノム DNA を鋳型とした場合には増幅されない断片である。したがって、この約 110bp の DNA 断片は、上記アルミニウム耐性因子に連鎖していると考えられ、また、染色体上でのマッピングを行うことにより、4H 染色体上でアルミニウム耐性因子から約 1.6 センチモルガン離れた位置に座乗していることが確認された（マッピングについては後述する）。

【0032】ところで、オオムギ個体がアルミニウム耐性であるか否か（すなわちアルミニウム耐性であるかアルミニウム感受性であるか）は、アルミニウムイオン存在下での栽培試験を通して実際に評価することができる。そして、ゲノム DNA を鋳型とし、配列番号 1 および配列番号 2 に記載のプライマーを用いて増幅した増幅パターンの相違が、アルミニウムイオン存在下での栽培試験の結果と対応することを確認することによって、本発明にかかる DNA マーカーの有効性を確かめることができる。

【0033】上記の栽培試験は、例えば次のような方法で行うことができる。

【0034】判定対象となるオオムギ個体の種子を所定の条件で発芽させ、発芽後の芽生えを酸性（一般には pH 4～5）に調整した水耕液に植え付けて水耕栽培を行う。芽生えを所定期間育成した後に水耕液を交換し、アルミニウム無処理区はこの水耕液のみで育成し、一方、アルミニウム処理区には、該水耕液に所定量のアルミニウムイオンが含まれるようアルミニウム化合物の水溶液を添加して育成を行う。アルミニウム処理区、アルミニウム無処理区ともにオオムギ個体を同一期間育成した後、得られた個体を地上部と根とに分けて秤量する。

【0035】なお、栽培試験において、水耕液の pH は試験期間を通じて常時一定の酸性条件に保たれるが、その値はオオムギ個体の種類や他の試験条件などにより適

宜選択すればよい。また、試験期間（オオムギ個体の育成期間）や、アルミニウムイオン濃度などの各種試験条件についても試験毎に適宜選択すればよい。また、試験期間を通じて試験環境を一定とするために、試験は人工気象環境下で行うことが望ましい。

【0036】アルミニウム耐性の評価値となる耐性スコアは、根重を地上部重で割った値の、アルミニウム無処理区に対するアルミニウム処理区の相対値として求めることができる。そして、耐性スコアがある値よりも大きければ、そのオオムギ個体はアルミニウム耐性と判定され、耐性スコアがその値よりも小さければ、そのオオムギ個体はアルミニウム感受性と判定される。

【0037】後述の実施例では、アルミニウム耐性種‘むらさきもち’と、アルミニウム感受性種‘Morex’とを交配し、F₂ 100個体および両親各10個体を上記試験に供して、アルミニウム耐性を評価した。その結果、耐性スコアの頻度分布はある値を境に耐性と感受性とに分けられ（図5参照）、つまり、この値を閾値とすると、アルミニウム耐性個体とアルミニウム感受性個体とが67：33の割合で分離された。このことから、‘むらさきもち’と‘Morex’との交配において、アルミニウム耐性は優性の1因子に支配されているとみられた。

【0038】前述のように、本発明のDNAマーカーは、4H染色体上でアルミニウム耐性因子から約1.6センチモルガン（cM）離れた位置に座乗していると認められるが、この距離は次のように算出された。

【0039】耐性スコアを耐性（T）と感受性（S）とに区分すると両者は3：1に分離した。また、上記DNAマーカーの遺伝子型をむらさきもち型（A）とMorex型（B）とすると、これらも3：1に分離する。もし両者に連鎖がない場合、メンデルの法則によってF₂におけるTA：TB：SA：SB型の比率は9：3：3：1となるはずであるが、この分離比に適合しない場合は、耐性スコアとマーカーとに連鎖（すなわち染色体上の近傍に遺伝子が位置すること）が存在する。耐性遺伝子とマーカーとが近いほど、TA型およびSB型の割合が多くなり、TB型およびSA型の割合が少なくなるので、これを数学的に計算して（最尤法）染色分体あたりの乗り換え率を求めることができる。1.6cMは、耐性スコアとマーカーとの間で染色分体あたり平均して1000分の16回乗り換えが起こることを示している。

【0040】オオムギ個体は、1）上記アルミニウム耐性因子をホモ型で有するか（以下、単にホモ型と称する）、2）ヘテロ型で有するか（以下、単にヘテロ型と称する）、3）劣性ホモ型となっている（すなわち、該アルミニウム耐性因子のアリールをホモ型で有するか、のいずれかに大別されると考えられる。そして、本発明にかかるアルミニウム耐性因子の有無の判別方法は、配列番号1および配列番号2で示す一組のプライマ

ーを用いて取得される本発明のDNAマーカーが、上記アルミニウム耐性因子に連鎖していることを利用する。つまり、配列番号1および配列番号2で示す一組のプライマーを用い、上記ホモ型またはヘテロ型のオオムギ個体のゲノムDNAを鋳型として増幅した場合には本発明のDNAマーカーの増幅が確認され、劣性ホモ型のオオムギ個体のゲノムDNAを鋳型とした場合には本発明のDNAマーカーが増幅されないという増幅パターンの相違に基づいて、アルミニウム耐性因子の有無の判別が可能となる。

【0041】このようなアルミニウム耐性因子の有無の判別方法を用いれば、オオムギの様々な品種について、簡単な方法でアルミニウム耐性因子の有無を判定することが可能となる。よって、例えば、オオムギ品種の育種に際し、交配親の候補の中からアルミニウム耐性因子を有するものを比較的容易に選別することが可能となる。また、交配により得られた雑種、新品種についてもアルミニウム耐性因子を有するか否かを比較的容易に判別することが可能となる。

【0042】例えば、上記‘むらさきもち’と‘Morex’とを交雑した集団の個体のDNAを抽出して本発明のDNAマーカーの多型を解析し、むらさきもち型を示す個体を選抜すれば、98.4%の確率でアルミニウム耐性を獲得できることになる。

【0043】また、後述のように、配列番号1および配列番号2で示す一組のプライマーを用い、オオムギ個体のゲノムDNAを鋳型として増幅を行うと、上記ホモ型のオオムギ個体では確認されないものの、上記ヘテロ型の個体や劣性ホモ型の個体では増幅される約140bpのDNA断片の存在も確認された。このことから、配列番号1および配列番号2で示す一組のプライマーを用い、オオムギ個体のゲノムDNAを鋳型として増幅を行うと、ホモ型、ヘテロ型、劣性ホモ型それぞれに特有な増幅パターンが得られる。つまり、本発明にかかるアルミニウム耐性因子の有無の判別方法は、該アルミニウム耐性因子をホモ型として有するか、ヘテロ型として有するかの判別まで可能である。したがって、ホモ型とヘテロ型との間でアルミニウム耐性の程度に違いが認められるときには、上記アルミニウム耐性因子の有無の判別方法は、オオムギ個体のアルミニウム耐性の程度を判定する方法としても利用可能である。

【0044】本発明のDNAマーカーを用いてアルミニウム耐性因子を含むDNA断片を単離する方法としては、例えば次のような方法を挙げることができる。

【0045】オオムギではゲノムDNAのBACライブラリーが1種類作成されており、現在複数のBACライブラリーが開発中である。そこで、このようなBACライブラリーを用いて、従来公知のマッピングスクローニングの手法にしたがって、耐性遺伝子と連鎖する本発明のDNAマーカーで当該マーカーを含むBACクローン

10

20

30

40

50

を同定し、そこからBACのコンティグを作成して塩基配列を確定することにより、最終的なアルミニウム耐性遺伝子に到達することができる。なお、オオムギのゲノムサイズは5000Mbであり、マップサイズを1500cMとすると、1cMは約3.3Mbになるから、1.6cMだと約5Mbの距離になる。

【0046】本発明にかかる形質転換植物、形質転換オオムギの作出には、上記の単離方法により得られたアルミニウム耐性因子を含むDNA断片を、公知の方法により、アグロバクテリウムまたはパーティクルガンを用いて植物やオオムギのゲノムDNAに導入することによって作出すればよく、これにより、酸性土壌でも生育可能な品種が得られることとなる。例えば、雑誌The Plant Journal(1997) 11(6),1369-1376 には、Sonia Tingay等により、Agrobacterium tumefaciens を用いてオオムギを形質転換する方法が開示されており、この方法を利用して形質転換オオムギを作出可能である。

【0047】

【実施例】まず、本発明の実施例で用いた材料および方法について説明する。

【0048】〔アルミニウム耐性の評価〕アルミニウム耐性種 ‘むらさきもち’ とアルミニウム感受性種 ‘More x’ およびそのF₂ 集団を20℃で5日間催芽し、pH4.3に調整した水耕液にF₂ 100個体および両親を各10個体植付けた。各個体を3日間生育させた後、水耕液を交換し、無処理区は水耕液のみで育成し、アルミニウム処理区には、100 μM AlK(SO₄)₂・6H₂O水溶液を30 μMとなるように加え処理を行った。実験は20℃、16時間日長の人工気象室内で行い、2反復を設けた。12日間処理条件下で育成した個体を地上部と根に分けて秤量し、地上部を鉢に移植してDNA抽出用の葉を採取した。耐性スコアは根重を地上部重で割った値の無処理区に対するアルミニウム処理区の相対値により求めた。

【0049】〔DNA抽出〕F₂ 集団および両親の個体から、下記文献①に示された方法によってDNAを抽出し、分光光度計および1%アガロースゲル電気泳動によって濃度を測定し、100ng/μlに調整した。

①Peter Langrige, Angelo Karakousis and Jan Nield. (1997) Practical Workshop in Basic Recombinant DNA Techniques Course Manual. Waite Agricultural Research Institute University of Adelaide.

〔バルクセグレガント分析〕F₂ 集団で耐性の大きい側と小さい側の両極端から10個体のDNAを等量ずつ混合し、耐性と感受性のバルクDNAをそれぞれ作成した。バルクDNAおよび両親のDNAを用いてAFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms)分析およびSSR(Simple Sequence Repeats)分析を行った。

【0050】AFLP分析では、図1に示されるプライマーを用いて、128のプライマー組合せによってバンドを確認した。Selective primerの組合せは他の文献を参考に

して多型の得られやすいものを選択した。なお、図1において、E-000は、EcoRIのuniversal primerを指し、E02,E03,E05,E08,E09,E12,E14,E15は、EcoRIのselective primerを指し、各塩基配列が各記号の右側に示される。また、M-000は、Mse Iのuniversal primerを指し、M17-M32の16のプライマーは、Mse Iのselective primerを指し、各塩基配列が各記号の右側に示される。

【0051】SSR分析では、4H染色体上に座乗する8個のSSRマーカーを選んで、それぞれバルク間での多型を調査した。以下、AFLP分析およびSSR分析について更に詳細に説明する。

【0052】〔AFLP分析〕下記文献②の方法に従って、150ngのDNAを各1.5UのEcoRI (TAKARA)およびMse I (NEW ENGLAND BioLabs)により、37℃で12時間ダブルダイジェストした。

②Pieter Vos, Rene Hogers, Marjo Bleeker, Martin Reijmans, Theo van de Lee, Miranda Hornes, Adrie Frijters, Jerina Pot, Johan Peleman, Martin Kuiper and Marc Zabeau. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research. 23:21:4407-4414. 制限酵素処理後のDNA 10 μl に2pmol EcoRI adaptor と20pmol Mse I adaptorを50UのT4 ligase(TAKARA)によって20℃、3時間ライゲーションし、10mM Tris-HCl 0.1mMEDTA(pH8.0)によって20倍希釈した。PreamplificationのPCR反応は全量を25 μlとしてライゲーションしたDNA 2.5 μl (20倍希釈)とプライマーおよび各試薬の終濃度が1.5ng/μl EcoRI universal primer, Mse I universal primer, 1×PCR Buffer, 0.2mM dNTP, 0.02U/μl ExTaq polymerase (TAKARA)となる条件で行った。Preamplificationしたサンプルは10mM Tris-HCl 0.1mMEDTA(pH8.0)で50倍に希釈した。PCR反応はPreamplification, Selective Amplificationとも図2に示されるプログラムによって Gene Amp PCR system 9700 (A.B.I.)を用いて行った。以降は、下記文献③の方法に従って、Selective Amplificationする際のプライマーの濃度を銀染色によって検出しやすように反応液10 μl当たり15ngとした。

③Y.Mano, S.Kawasaki, F.Takaiwa, T.Komatsuda. Development of a simple and efficient AFLP technique and construction of an STS-AFLP map in barley (in press). Selective amplificationはPreamplificationしたDNA(50倍希釈) 2.0 μlとプライマーおよび各試薬の終濃度が1.5ng/μl EcoRI selective primer, Mse I selective primer, 1×PCR Buffer, 0.2mM dNTP, 0.025U/μl ExTaq polymerase(TAKARA)の条件全量を10 μlとしPCR反応を行った。増幅したサンプルは等量のホルムアミドダイを加え、95℃ 5分間加熱し、氷中で急冷した。急冷したサンプルを16cm角スラブゲルを用いて7%変性ポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド (Wako): ピ

ス(Wako)=19:1, 0.5×TBE, 8.5M 尿素) で1枚当たり32サンプルを同時に4枚電気泳動(280V, 3時間)し、Si1-Best Stain for Protein/PAGE(nakalai tesque, INC.)を用いて銀染色によりバンドを検出した。なお、銀染色は下記文献④に記載されている。

④菅野 康吉 (1997) 増幅断片の検出と標識5銀染色, PCR 法最前線 基礎技術から応用まで, 関谷 剛男 藤永 編, 共立出版, 東京, 85-87.

〔SSR 分析〕SSR 分析には、アルミニウム耐性因子が4H染色体に座乗するとする既報を参考に、4H染色体上に座乗する8個のSSR マーカー(すなわち、HVM13, HVM40, HVM67, HVM68, HVM77, HVM3, Bmaq0353 および Bmaq0384)を選んだ。PCR 反応液の組成は0.05U/μl AmpliTaq DNA polymerase, 1×PCR Buffer, 0.25mM MgCl₂, 0.6mM dNTPs, 1pmol/μl primer (forward, reverse共)を全量10.0μlとした。PCR 反応は、マーカーHVM3については図3のSSR3、マーカーBmaq0353およびBmaq0384については同図のSSR2、その他のマーカーについてはSSR4のプログラムで行った。

〔0053〕5'側を hex (黄) で蛍光標識しているHVM3は、サンプル1.0 μl にサイズスタンダード (TAMRA GS 500) 0.5 μl、脱イオンホルムアミド 12.0 μl を加え、95℃で3分間加熱後水中で5分以上急冷し、急冷したサンプルを ABI PRISM[™] 310 Genetic Analyzer (A. B. I.)によって検出した。PCR 産物のサイズ決定はフラグメント解析用ソフトウェアGeneScan (A. B. I.)により行い、alleleの決定にはDNA フラグメント解析用ソフトウェアGenotyper[™] (Version1.1, A. B. I.)を用いた。また、蛍光標識されていないHVM3以外のマーカーについてはサンプルに等量のホルムアミドを加え、95℃ 5分間加熱後水中で急冷し、急冷したサンプルをAFLPの方法に準じて16cm角スラブゲルを用いて変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、銀染色によりバンドを検出した。

〔0054〕上記SSR マーカーのうち、HVM3については文献「Z.W.Liu, R.M.Biyashev, M.A.Shaghai Maroof.(1996) Development of simple sequence repeat DNA markers and integration into a barley linkage map. Theor. Appl. Genet. 93:869-876」に記載されており、そのプライマー配列は、

ACACCTTCCCAGGACAATCCATTG

AGCAGGAGACACCGAAAAAGTC

である。

〔0055〕また、Bmaq0353は、Waugh からの私信で入手したマーカーであり、そのプライマー配列は、

ACTAGTACCCATATGCACGA

ACGTCATTAAATCACAACTG

である。

〔0056〕〔連鎖分析〕連鎖地図の作成はMAPMAKER/EXP3.0を用いて連鎖検出の閾値をLOD 3.0で行い、地図

距離は下記文献⑤の方法によった。

⑤Kosambi, D.D. (1944) The estimation of map distance from recombination values. Ann. Eugen. 12:172-175.

次に、本実施例の結果について説明する。

〔0057〕〔アルミニウム耐性の評価〕30μMのアルミニウム処理条件下で12日間生育させた両親系統およびF₂ 個体の根の生育状態を図4に示した。同図において、Aは「むらさきもち」、Bは「Morex」、CはF₂ 耐性個体、DはF₂ 感受性個体を示す。

〔0058〕耐性スコアの頻度分布は、図5に示されるように0.24を境に耐性と感受性に分けられ(耐性:感受性 = 67:33 $\chi^2=3.41$ 0.1<P<0.05)、「むらさきもち」と「Morex」の交配においてアルミニウム耐性は優性の1因子に支配されているとみられた。なお、図5のグラフにおいて、横軸は耐性スコアを、縦軸は植物体の数を示す。

〔0059〕〔アルミニウム耐性に関与するDNAマーカーの探索〕AFLPをバルクセグレガント法に適用し、128のプライマー組合せについてバルク間および両親の間で多型を示すバンドをスクリーニングした結果、16のプライマー組合せについて多型が認められた。その16組合せに関して、耐性、感受性各4個体による2次スクリーニングを行ったところ、E05-M26、E12-M29の組合せのプライマーについて再現性のある多型が得られた。この2つのマーカーをF₂ 集団60個体のマーカー型の調査に用いた。

〔0060〕また、SSRを適用したバルクセグレガントでは染色体4Hに座乗する8マーカーについてスクリーニングした結果、HVM3、Bmaq0353の2マーカーについて多型が得られたため、AFLPマーカーと同様に個体のマーカー型の調査に用いた。

〔0061〕図6の(a)には、AFLPの上記E05-M26のプライマー組合せにおける電気泳動後のゲル像が示され、図6の(b)には、SSRのマーカーBmaq0353における電気泳動後のゲル像が示される。図中、BTとBSはそれぞれ耐性と感受性のバルクDNAであり、1~7は耐性のF₂ 個体、8~14は感受性のF₂ 個体である。耐性と感受性との間で多型が認められたバンドが、図中矢印で示されている。

〔0062〕同図(b)に示されるように、上記マーカーBmaq0353の場合、特徴的な2つのバンドが認められ、このうち、より短いバンド(約110bp)は、耐性のBTおよび1~7で認められ、感受性のBSおよび8~14では認められなかった。したがって、このマーカーBmaq0353を、本発明のDNAマーカーとして用いることにより、アルミニウム耐性種か否かを高い確率で予測でき、耐性種の選抜も容易になる。

〔0063〕また、特徴的な2つのバンドのうち、より長いバンド(約140bp)は、感受性のBSおよび8~14

のみならず、耐性の 3～5、7でも認められた。このことから、耐性の 1～7のうち、1、2、6はアルミニウム耐性因子についてホモ型であり、3～5、7はヘテロ型であると推測される。つまり、上記マーカーBmaq0353を、本発明のDNAマーカーとして用いることにより、アルミニウム耐性因子をホモ型として有するか、ヘテロ型として有するかの判別まで可能である。したがって、ホモ型とヘテロ型との間でアルミニウム耐性の程度に違いが認められるときには、上記マーカーBmaq0353は、アルミニウム耐性の程度を判定する方法としても有効である。

【0064】〔アルミニウム耐性のマッピング〕F₂集団より無作為に60個体を抽出した。頻度分布から耐性はほぼ1因子により支配されているとみられたので、スコア0.24を境にして個体を耐性と感受性に分け、耐性スコアとSSRマーカー2種類、AFLPマーカー2種類の連鎖を計算した。しかし、AFLPマーカーのうち1種類(E12-M2 *

* 9) については誤分類の可能性が認められたため解析からはずし計算したところ、耐性は図7に示すように4H染色体上にマップされた。

【0065】同図に示すように、マーカーBmaq0353は、アルミニウム耐性因子(図中、Al Toleranceと記載)から約1.6センチモルガン(cM)の距離に位置しており、このようにアルミニウム耐性因子と強連鎖している程、アルミニウム耐性因子の有無を判別する指標として有効である。

10 【0066】

【発明の効果】本発明のDNAマーカーは、以上のように、アルミニウム耐性因子に連鎖しているので、例えば、オオムギのある品種がアルミニウム耐性因子を有するか否かを高い確率で予測できる、という効果を奏する。

【0067】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> アルミニウム耐性因子に連鎖するDNAマーカー、及びその利用

<130> A182P11

<160> 2

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotides

<400> 1

actagtaccc actatgcacg a

21

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotides

<400> 2

acgttcatta aatcacaac tg

22

【図面の簡単な説明】

【図1】AFLP分析に使用されたuniversal primerおよびselective primerを示す表である。

【図2】AFLP分析において、PreamplificationおよびSelective Amplificationの各増幅に使用されたPCR反応のプログラムを示す表である。

【図3】SSR分析において、各マイクロサテライトの増幅に使用されたPCR反応のプログラムを示す表である。

【図4】アルミニウム処理条件下で12日間生育させた両親系統およびF₂、個体の根の生育状態を示す図であり、Aは「むらさきもち」、Bは「Morex」、CはF₂耐性個体、DはF₂感受性個体を示す。

【図5】「むらさきもち」と「Morex」との交配によるF₂個体のアルミニウム耐性スコアの頻度分布を示すグラフである。

【図6】「むらさきもち」と「Morex」とを交配させてアルミニウム耐性をバルクセグレガント分析した結果を示すゲル電気泳動像であり、(a)は、E05-M26のブライマー組合せを用いた場合のゲル像であり、(b)は、マーカーBmaq0353を用いた場合のゲル像である。

【図7】オオムギ4H染色体上における、アルミニウム耐性のマイクロサテライトマーカー(Bmaq0353, HVM3)およびAFLPマーカー(E05-M26)を含む連鎖地図を示す図である。

【図1】

(EcoRI universal primer)			
E-000 5-GACTGCGTACCAATTC-3			
(EcoRI selective primers)			
E02	E000+AAC		
E03	E000+AAG		
E05	E000+ACA		
E08	E000+ACT		
E09	E000+AGA		
E12	E000+AGT		
E14	E000+ACT		
E15	E000+ATG		
(MseI universal primer)			
M-000 5-GATGAGTCCTGAGTAA-3			
(MseI selective primers)			
M17	M-000+CAA	M25	M-000+CGA
M18	M-000+CAC	M26	M-000+CGC
M19	M-000+CAG	M27	M-000+CGG
M20	M-000+CAT	M28	M-000+CGT
M21	M-000+CCA	M29	M-000+CTA
M22	M-000+CCC	M30	M-000+CTC
M23	M-000+CCG	M31	M-000+CTG
M24	M-000+CCT	M32	M-000+CTT

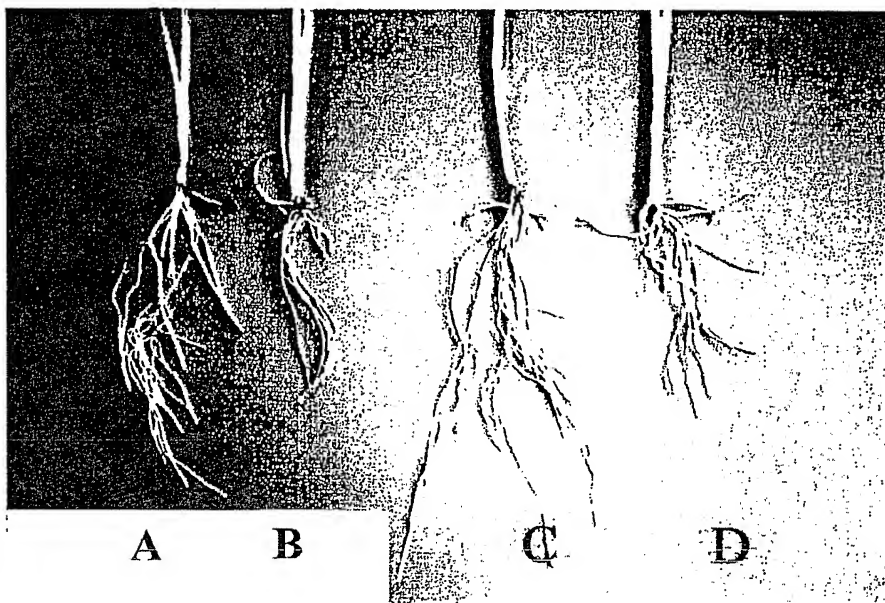
【図2】

Preamplification		Selective amplification	
20cycles	30sec 94°C	1cycle	30secs 94°C
	1min 56°C		30secs 65°C
	1min 72°C		1min 72°C
		12cycles	30secs 94°C
			30secs 65°C (>0.7°C/cycle)
			1min 72°C
		23cycles	30secs 94°C
			30secs 55°C
			1min 72°C

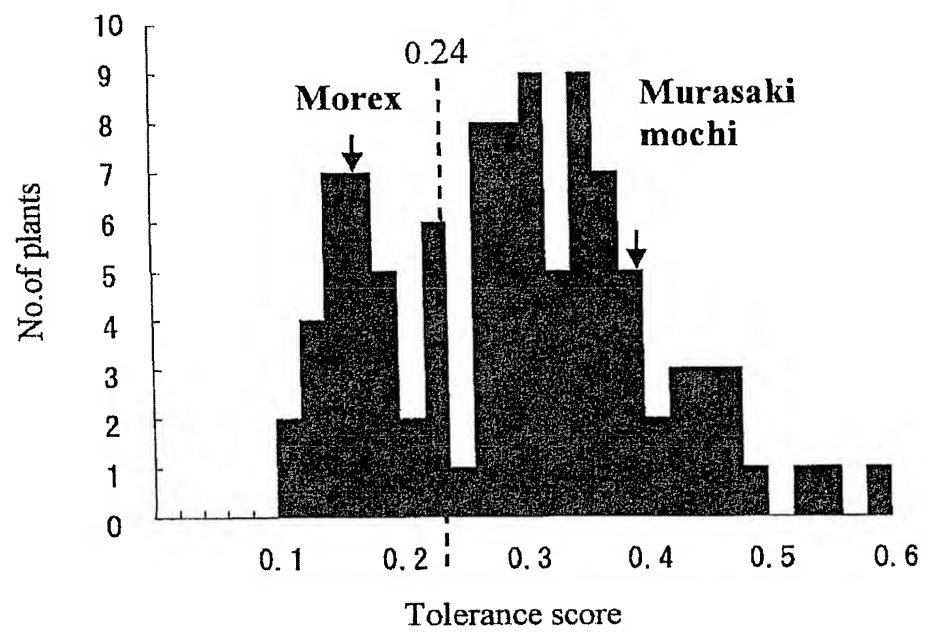
【図3】

	SSR2	SSR3	SSR4
1cycle	3mins 94°C	1cycle 3mins 94°C	3mins 94°C
	1min 58°C	1min 55°C	1min 94°C
	1min 72°C	1min 72°C	1min 64°C(>1°C/cycle)
30cycles	30secs 94°C	1min 94°C	1min 72°C
	30secs 58°C	1min 55°C	1min 94°C
	30secs 72°C	1min 72°C	1min 55°C
Hold	5mins 72°C	5mins 72°C	1min 72°C
		Hold	5mins 72°C

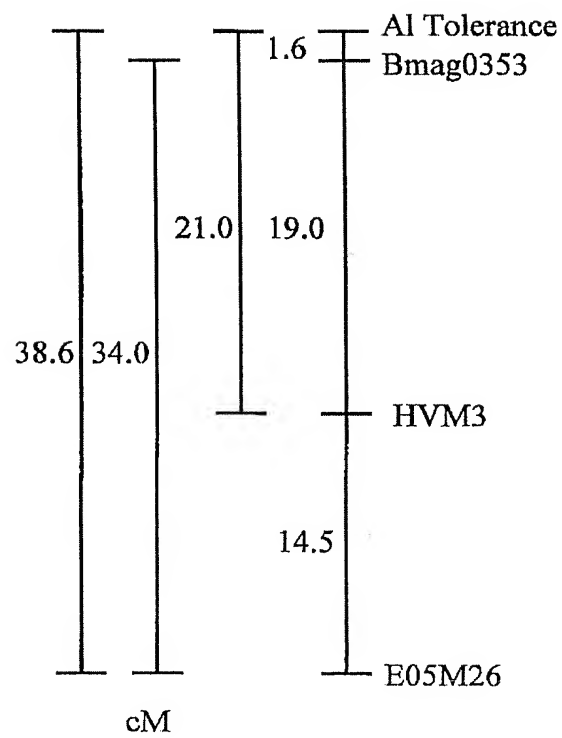
【図4】



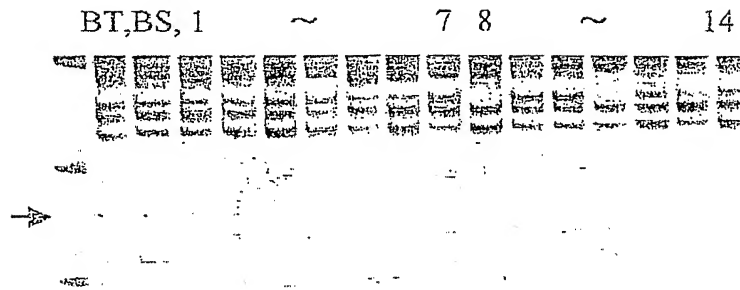
【図5】



【図7】



【図6】



(a) E05M26

BT,BS, 1 ~ 7 8 ~ 14



(b) Bmag0353

フロントページの続き

F ターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD20 CA06 CA16
 CB02
 4B024 AA08 AA11 BA80 CA03 DA01
 EA04 FA10 GA11 HA12
 4B063 QA01 QA05 QQ09 QQ43 QR08
 QR33 QR42 QR62 QR78 QS25
 QS34 QX02